罗汉果苷 IIE 在巨噬细胞糖尿病炎症模型中的作用

黄 凯[1]，肖 娟[1]，李爱丽[2*]

（1. 广西肝脏损伤与修复分子医学重点实验室， 桂林医学院附属医院， 广西 桂林 541001；2. 桂林医学院附属医院， 广西 桂林 541001 ）

摘要：为研究罗汉果苷 IIE 在脂多糖（LPS）和棕榈酸（PA）联合诱导小鼠巨噬细胞糖尿病炎症模型中的作用，该文采用 1 ng·μL^{-1}的脂多糖（LPS）和 100 μmol·L^{-1}棕榈酸（PA）联合处理小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 构建糖尿病炎症模型，并运用 qRT-PCR 分别检测 0、1、3、6、12、24 h 6 个不同时间点细胞中炎症因子 TNF-α mRNA 的表达水平变化。结果表明：（1）1 ng·μL^{-1}的 LPS 和 100 μmol·L^{-1} PA 两者共同处理小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 在 24 h 时产生的炎症协同作用最好；（2）进而在 1 ng·μL^{-1}LPS 和 100 μmol·L^{-1}PA 联合诱导小鼠巨噬细胞 12 h 后，用 20 μmol·L^{-1}罗汉果苷 IIE 处理 12 h，应用 qRT-PCR 检测细胞炎症因子 TNF-α mRNA 的表达变化，发现 20 μmol·L^{-1}罗汉果苷 IIE 处理 12 h 可显著降低 LPS 和 PA 联合诱导的 TNF-α mRNA 表达水平，说明罗汉果苷 IIE 能够有效降低巨噬细胞的炎症水平。综上认为，罗汉果苷 IIE 可能在治疗糖尿病中起到一定的作用，这为糖尿病治疗新策略的提出提供了参考。

关键词：糖尿病炎症模型，罗汉果苷 IIE，脂多糖，棕榈酸，小鼠巨噬细胞

Mogroside IIE effect on the macrophage in diabetes inflammatory models

HUANG Kai[1], XIAO Juan[1], LI Aili[2*]

(1. *Guangxi Laboratory Molecular Medicine in Liver Injury and Repair*, *Affiliated Hospital of Guilin Medical University*, Guilin 541001, Guangxi, China; 2. *Guilin Medical University*, Guilin 541001, Guangxi, China)

Abstract: To explorer the mogroside IIE effect on macrophages in mice diabetes inflammation model by induced with lipopolysaccharide and palmitic acid, 1 ng·μL^{-1} LPS and 100 μmol·L^{-1} PA were combined treatment for macrophages in mice RAW 264.7, and the mRNA expression

基金项目： 广西高校中青年教师科研基础能力提升项目（2020KY12019）[Supported by Project of Young and Middle-aged Teachers Basic Ability Promotion for Scientific and Technological Research of College and Universities in Guangxi（2020KY12019）]。

第一作者： 黄凯(1990-)，硕士，助理研究员，从事基础医学研究，（E-mail）604655840@qq.com。

***通信作者**： 李爱丽，硕士，助理研究员，长期从事基础医学研究，（E-mail）262608860@qq.com。

changes of TNF-α was detected by qRT-PCR. Also the macrophages in mice with induced by lipopolysaccharide and palmitic acid after 24 h was treated with 20 μmol·L^{-1} Mogroside IIE and the mRNA expression change of inflammatory factor TNF-α was detected by qRT-PCR at different points of time 1, 3, 6, 12, 24 h. The results showed the synergistic effect of inflammation in macrophages in mice RAW 264.7 by treatment with 1 ng·μL^{-1} LPS and 100 μmol·L^{-1} PA after 24 h was maximum. All the above results indicate that 20 μmol·L^{-1} mogroside IIE can reduce the mRNA expression of inflammatory factor TNF-α in macrophages in mice by treatment with LPS and PA, which provides the reference for new therapy of diabetes.

Key words: inflammation model of diabetes, mogroside IIE, lipopolysaccharide, palmitic acid, macrophages in mice

糖尿病作为一种慢性代谢性疾病，近年来发病率逐渐上升。据统计，糖尿病的危害程度仅次于肿瘤和心血管疾病，是威胁人类健康的第三大疾病，给全世界人们带来了巨大的经济负担 (Lassenius et al., 2011)。有研究发现，糖尿病的患者常伴有脂代谢紊乱，主要表现为血浆游离脂肪酸（free fatty acid，SFA）浓度增高，特别是棕榈酸（palmitic acid，PA）含量的增高(Ruiz-nez et al., 2016)。SFA 以及其他因素共同作用可使得革兰氏阴性菌细胞壁的组成部分脂多糖（Lipopolysaccharide，LPS）呈低水平增高 (Das et al.,2010；Hellmann et al., 2013)。随着体内循环的 LPS 和 SFA 增加，它们可能产生协同作用，进而促进一种强烈的炎症反应，而这种促炎反应远超于 LPS 或 SFA 单独作用。近年来，炎症反应在糖尿病发生发展中的作用受到广泛关注，越来越多的炎症介质及免疫标志物, 如 C 反应蛋白(CRP) 、肿瘤坏死因子α（TNF-α）、白细胞介素 6（IL-6）、血浆纤溶酶原激活等都与糖尿病及其并发症密切相关，且被认为是肥胖和糖尿病的预测因子。因此，减弱由 LPS 和 SFA 协同产生的强烈促炎反应对于糖尿病的治疗至关重要。

罗汉果 (*Siraitia grosvenorii*) 是我国广西特有的传统药食同源植物，属于葫芦科家族成员。经检测罗汉果内富含蛋白质、维生素、微量元素、多糖等营养成分，同时还含有葫芦烷三萜皂苷和黄酮等多种活性成分，其中葫芦烷三萜化合物为罗汉果主要功能成分。现代药理研究证实，罗汉果不仅具有止咳祛痰、抗氧化、抗炎等药理作用，而且还能显著干预糖脂代谢异常。有研究发现，给患有糖尿病的小鼠服用罗汉果苷可以预防和减少糖尿病并发症 (Qi et al.,2008；Song et al., 2007；Suzuki et al., 2007)。罗汉果苷 IIE 是一种苦味三萜皂苷，也是罗汉果苷 V 的前体，为未成熟罗汉果的主要成分。然而，罗汉果苷 IIE 在糖尿病治疗当中的作用，至今仍然未知。

有研究表明，巨噬细胞可在宿主防御机制中发挥关键作用，并可在促炎细胞因子和细菌LPS暴露下被激活 (Xie et al.,1993；Zhang & Ghosh., 2000)。被诱导的巨噬细胞大量产生促炎细胞因子，如TNF-α、IL-1、IL-6和NO、PGE2等。这些促炎因子在炎症性疾病中发挥关键作用 (Vane et al., 1994；Marks-konczalik et al., 1998)。由于血浆中丰富的脂肪酸棕榈酸（PA）的增加可导致II型糖尿病的血脂异常，表明PA是一种重要的参与糖尿病的脂肪酸。同时临床研究报道肥胖患者血液循环中脂多糖(LPS)升高，进而LPS可通过TLR4信号通路触发炎症反应，激活组织炎症因子。综上糖尿病合并肥胖患者可能同时存在PA升高和LPS升高。 因此，本文采用脂多糖（LPS）和棕榈酸（PA）联合处理小鼠巨噬细胞RAW 264.7构建糖尿病炎症模型，该模型的建立能客观的模拟糖尿患者体内因PA和LPS失调引起的炎症反应，同时能简便、节约、快速、客观的观察实验结果，具有一定的创新性。紧接着我们在该糖尿病模型的基础上研究罗汉果苷IIE对细胞内炎症因子TNF-α mRNA的影响，旨在探索罗汉果苷IIE治疗糖尿病的潜在可能性，为糖尿病治疗新策略的提出提供参考依据。

1　材料与方法

1.1 材料

棕榈酸（PA）、脂多糖（LPS）均购自Sigma公司；罗汉果苷IIE购自成都曼斯特生物科技有限公司（http://www.cdmust.com/），并溶于甲醇配置成20 $\mu mol \cdot L^{-1}$溶液。

1.2 PA母液的配置

将一定量的PA加入到含0.1 $mol \cdot L^{-1}$ NaOH的70%乙醇中，70 ℃水浴溶解 ，混匀后冷却至室温，待用。

1.3 细胞培养

小鼠巨噬细胞RAW 264.7购自上海生命科学研究院细胞资源中心，细胞接种于含10%胎牛血清的DMEM（购自Gibco公司）完全培养基中，置于37 ℃ 5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养。

1.4　qRT-PCR检测加药后细胞中TNF-α mRNA表达水平的变化

收集各组加药后24 h生长状态良好的RAW 264.7细胞，采用Trizol 法提取细胞中总RNA，用反转录试剂盒合成cDNA，以cDNA为模板，采用SYBR Green Gene Expression Assay试剂盒分别检测转染后各组细胞中TNF-α和内参GAPDH mRNA的表达。该实验采用40个循环，扩增程序为：94 ℃预变性5 min，94 ℃变性30 s，60 ℃退火10 s，72 ℃延伸30 s 。扩增结束后统计各组CT值，采用相对定量$2^{-▲▲CT}$计算各组RAW 264.7细胞中TNF-α mRNA

相对表达水平。TNF-α引物序列为 F: 5'-CTT CAG GGA TAT GTG ATG GAC TC-3'; R: 5'-GGA GAC CTC TGG GGA GAT GT-3'; GAPDH 的引物序列为 F: 5'-GGTGCTGAGTATGTCGTG-3'; R: 5'-TTCAGCTCTGGGATGACC-3'。

1.5 统计学分析

实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，利用 SPSS 21.0 软件进行数据分析，多组间差异以单因素方差分析，两两组间差异以 SNK-q 检验分析，$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 LPS 和 PA 诱导小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 后 TNF-α mRNA 表达水平的变化

本研究的实验部分可以分为 4 个组，即未处理组（NC）、PA 单独诱导组、LPS 单独诱导组以及 PA 和 LPS 联合诱导组。经上述处理后分别于 0、1、3、6、12、24 h 六个不同时间点收集细胞，并采用 qRT-PCR 检测细胞中炎症因子 TNF-α mRNA 表达水平的变化。由图 1 可知，1 ng·μL^{-1} LPS 诱导产生的 TNF-α mRNA 表达水平在 1、3、6、12 h 时间点均显著高于未处理组（NC）的,差异具有统计学意义（$P<0.05$）；100 μmol·L^{-1} PA 诱导产生的 TNF-α mRNA 表达水平在 1、3、6、12、24 h 时间点均与未处理组（NC）无显著差异（$P>0.05$）；经 LPS 和 PA 联合诱导后的细胞内 TNF-α mRNA 表达水平在 1、6、24 h 时间点均显著高于 LPS、PA 的单独诱导组，差异具有统计学意义（$P<0.05$），且在 24 h 时间点差异最显著，这说明 1 ng·μL^{-1} LPS 和 100 μmol·L^{-1} PA 联合诱导 RAW 264.7 细胞在 24 h 时间点产生的协同作用最佳。因此，我们将 24 h 作为 LPS 和 PA 联合处理的最佳诱导时间。

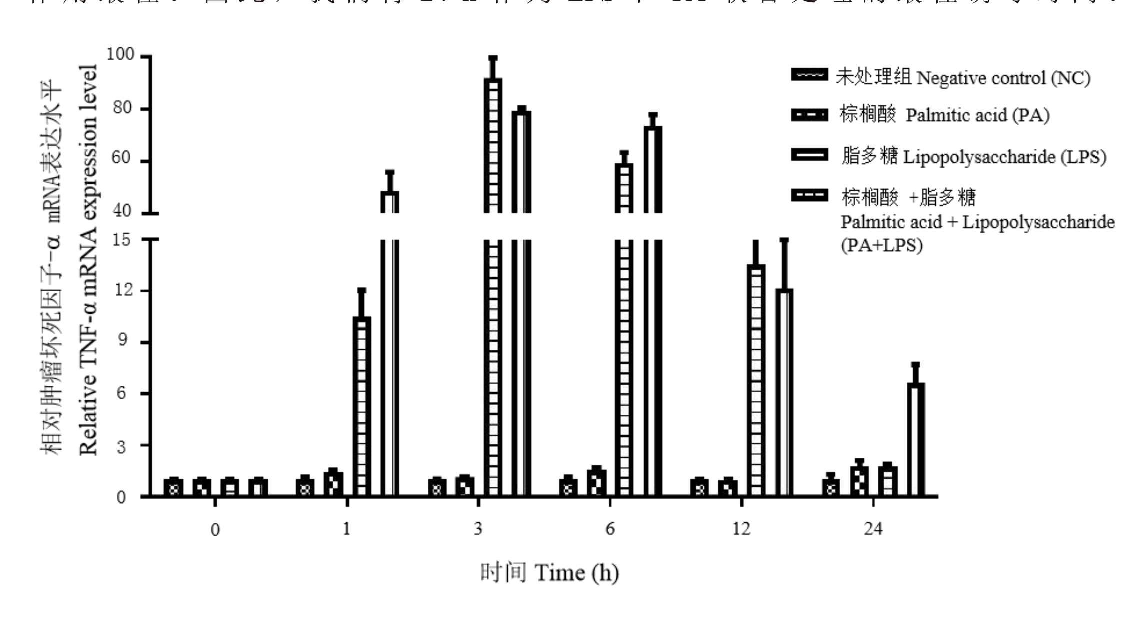
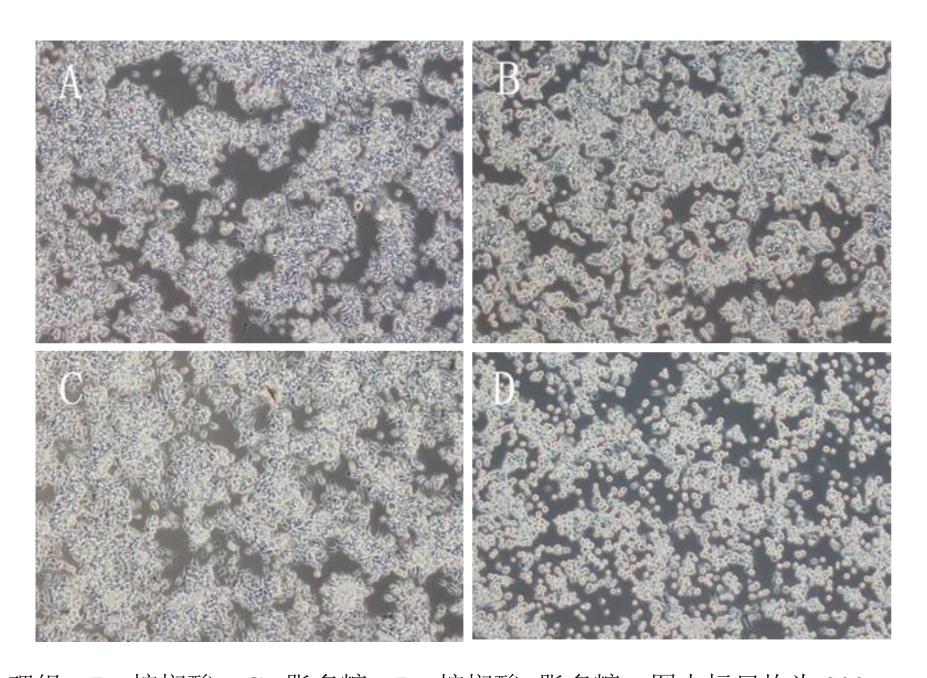


图 1 LPS 和 PA 诱导小鼠巨噬细胞后各组细胞中 TNF-α mRNA 表达水平随时间变化情况

Fig. 1 Change of TNF-α mRNA expression with time in each group

2.2 LPS 和 PA 诱导 24 h 后小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 的变化

从图 2 可以看出，小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 经 LPS 和 PA 分别单独诱导以及 LPS 和 PA 联合诱导 24 h 后小鼠巨噬细胞发生变化。图 2 结果显示，LPS+PA 联合诱导组的细胞数最少且含有少量的死细胞，而 LPS 诱导组的细胞数最多，这进一步说明 1 $ng \cdot \mu L^{-1}$ LPS 和 100 $\mu mol \cdot L^{-1}$ PA 两者共同处理小鼠巨噬细胞 24 h 后产生的炎症协同作用最好。因此，选用 24 h 为 LPS 和 PA 联合诱导的最佳时间。



A. 未处理组；**B**. 棕榈酸；**C**. 脂多糖；**D**. 棕榈酸+脂多糖。图中标尺均为 200 μm。

A. Negative control ; **B**. Palmitic acid ; **C**. Lipopolysaccharide ; **D**. Palmitic acid + Lipopolysaccharide. All scale bars = 200 μm.

图 2 LPS 和 PA 诱导小鼠巨噬细胞 24 h 后小鼠巨噬细胞的变化情况

Fig. 2 Morphological change of mouse macrophage induced by LPS and PA for 24 h

2.3 罗汉果苷 IIE 可有效抵制 LPS 和 PA 联合诱导产生炎症协同作用

应用 qRT-PCR 分别检测 0、6、12、24 h 四个不同时间点细胞中炎症因子 TNF-α mRNA 的表达水平（图 3）。图 3 结果显示，20 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 罗汉果苷 IIE 处理 12 h 可显著降低 LPS

和 PA 联合诱导生成的 TNF-α mRNA 表达水平，差异具有统计学意义（$P<0.05$）；而对由 LPS 或 PA 单独诱导产生的 TNF-α mRNA 表达水平无显著差异（$P>0.05$）。这说明罗汉果苷 IIE 可以抑制 LPS（1 ng•μL^{-1}）和 PA（100 μmol•L^{-1}）联合诱导产生细胞炎症反应，从而有效降低巨噬细胞的炎症水平。

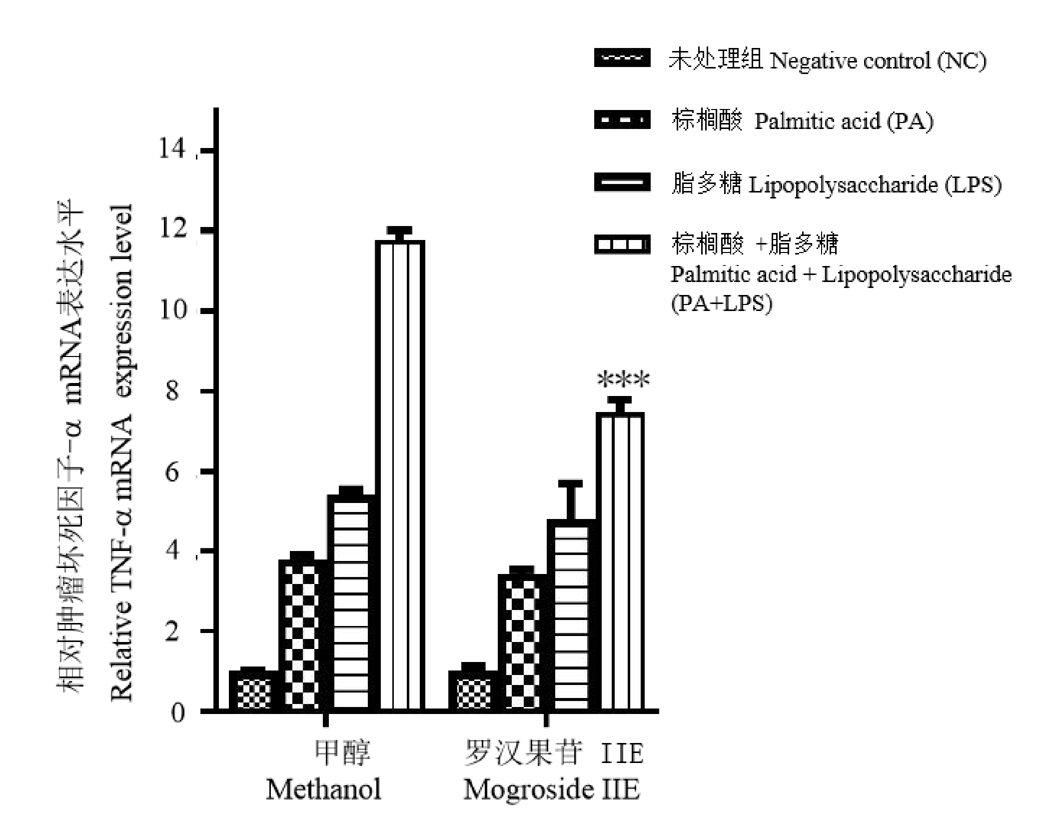


图 3　罗汉果苷 IIE 处理经 PA 和 LPS 单独或者联合诱导的小鼠巨噬细胞 12h 后各组细胞中 TNF-a mRNA 表达水平变化

Fig. 3　Changes of TNF-a mRNA expression in mouse macrophages induced by PA and LPS alone or in combination with mogroside IIE for 12h in each group

3　讨论与结论

糖尿病炎症的调控对糖尿病的治疗至关重要。Guariguata 等 (2014)研究表明，糖尿病是一种复杂的以高血糖为特征的代谢性疾病，严重影响患者的生活质量。Wellen 等（2005）研究表明，该代谢性疾病与炎症的异常产生和炎症信号通路的激活密切相关。本研究用小鼠巨噬细胞来模拟糖尿病炎症模型时的 LPS 和 PA 所选浓度与 Xiao 等（2020）所报道的一致，

我们的实验结果也显示在该浓度下两者共同作用可诱导炎症协同效应。同时在糖尿病病人体内，炎症反应也可对人体细胞造成一定的伤害，说明所选浓度具有可行性。

本课题组肖娟博士2020年所发表的文章结果发现，20 μmol·L-1罗汉果苷在细胞模型和小鼠中可通过下调IL-9/IL-9受体通路改善胰腺炎的实验证据（Xiao et al., 2020），并且由于本实验涉及的分组比较多，因此在采用罗汉果苷IIE处理小鼠巨噬细胞炎症模型时，我们只检测了不同时间点LPS和PA联合诱导生成的TNF-α mRNA表达变化。本研究结果发现，处理12 h的效果最佳，用20 μmol·L^{-1}罗汉果苷IIE 处理12 h能显著降低细胞内PA和LPS联合诱导的协同炎症反应，而对于PA或者LPS单独诱导的炎症反应无显著作用。但是，此具体作用机制目前还不甚清楚，有待进一步地深入研究。

罗汉果苷IIE是由可食用的罗汉果果实中提取而来，且罗汉果中的糖类在人体内升糖作用弱，基于这一点，罗汉果苷IIE可以成为糖尿病人辅助治疗的一个重要方向，因此本项目研究结果将对开发有效的抗糖尿病炎症药物以及改善糖尿病患者的生活质量具有重要的指导意义。另外，罗汉果苷IIE为未成熟罗汉果中含量最高的苷类，而每年丰收季节未成熟的罗汉果仍然占有一定的比例，本研究结果既有助于提高未成熟罗汉果的利用价值，又对罗汉果成体经济价值的提升有益。

参考文献：

DAS M, PAL S, GHOSH A, 2010. Association of metabolic syndrome with obesity measures, metabolic profiles, and intake of dietary fatty acids in people of Asian Indian origin[J]. J Cardiovasc Dis Res, 1(3):130-135.

GUARIGUATA L, WHITING D, HAMBLETON I, et al., 2014. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035 [J]. Diabetes Res Clin Pract, 103(2):137-149.

HELLMANN J, ZHANG M J, TANG Y, et al., 2013. Increased saturated fatty acids in obesity alter resolution of inflammation in part by stimulating prostaglandin production [J]. J Immunol, 191(3):1383-1392.

LASSENIUS MI, PIETILINEN KH, KAARTINEN K, et al., 2011. Bacterial endotoxin activity in human serum is associated with dyslipidemia, insulin resistance, obesity, and chronic inflammation[J]. Diabetes Care, 34(8):1809-1815.

MARKS-KONCZALIK J, CHU SC, MOSS J, 1998. Cytokine-mediated transcriptional induction of the human inducible nitric oxide synthase gene requires both activator protein 1 and nuclear factor κB-binding sites[J]. J Biol Chem, 273(35):22201-22208.

QI XY, CHEN WJ, ZHANG LQ, et al., 2008. Mogrosides extract from *Siraitia grosvenori* scavenges free radicals *in vitro* and lowers oxidative stress, serum glucose, and lipid levels in alloxan-induced diabetic mice [J]. Nutr Res, 28(4):278-284.

RUIZ-NEZ, BEGOA, DIJCK-BROUWER, et al., 2016. The relation of saturated fatty acids with low-grade inflammation and cardiovascular disease [J]. J Nutr Biochem, 36:1-20.

SONG F, QI X, CHEN W, et al., 2007. Effect of Momordica grosvenori on oxidative stress

pathways in renal mitochondria of normal and alloxan-induced diabetic mice. Involvement of heme oxygenase-1 [J]. Eur J Nutr, 46(2):61-69.

SUZUKI YA, TOMODA M, MURATA Y, et al., 2007. Antidiabetic effect of long-term supplementation with Siraitia grosvenori on the spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rat [J].Br J Nutr, 97(4):770-775.

VANE JR, MITCHELL JA, APPLETON I, et al., 1994. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation [J]. Proceed Natl Acad Sci USA, 91(6):2046-2050.

WELLEN KE, HOTAMISLIGIL GS, 2005. Inflammation, stress, and diabetes [J]. J Clin Invest, 115(5):1111-1119.

XIAO J, HUANG K, LIN H, et al., 2020. Mogroside IIE inhibits digestive enzymes via suppression of interleukin 9/interleukin 9 receptor signalling in acute pancreatitis [J]. Front Pharmacol, 11:859-870.

XIE QW, WHISNANT R, NATHAN C, 1993. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide [J]. J Exp Med, 177(6): 1779-1784.

ZHANG GL, GHOSH S, 2000. Molecular mechanisms of NF-kappaB activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors [J]. J Endotoxin Res, 6(6):453-457.